Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Richard-Ernst Bader

Untersuchungen zur Optimierung der Abtrennung eines wasserdampfflüchtigen Nitrosamins aus biologischem Material und zum Nachweis von Nitrosaminen mit Hilfe der Photolyse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Martin Knebel
aus Schramberg

1974

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Richard-Ernst Bader

Untersuchungen zur Optimierung der Abtrennung eines wasserdampfflüchtigen Nitrosamins aus biologischem Material und zum Nachweis von Nitrosaminen mit Hilfe der Photolyse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Martin Knebel
aus Schramberg

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. W. Schlote

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Sander

2. Berichterstatter: Professor Dr. R.-E. Bader

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. J. Sander für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0109

Inhalt

		S.
I	Einleitung und Problemstellung	1
II	Experimenteller Teil	5
	A) Material	5
	B) Methodik	5
	C) Ergebnisse	13
III	Beurteilung	25
IV	Zusammenfassung	29
V	Literaturverzeichnis	30

I. Einleitung und Problemstellung.

Seit Magee und Barnes Dimethylnitrosamin zunächst als Lebergift beschrieben (1954) und wenig später dessen krebserzeugende Wirkung entdeckten (1956), gewann die Erforschung dieses Stoffes und der ganzen Stoffgruppe, der Nitrosamine, deren chemische Gemeinsamkeit eine von zwei beliebigen aromatischen oder aliphatischen Resten substituierte Nitrosogruppe darstellt, in großem Maße an Bedeutung. In den folgenden Jahren wurden in mehreren Laboratorien durch systematische Molekülveränderungen die verschiedensten Nitrosoverbindungen synthetisiert und auf ihre carcinogene Wirkung geprüft. Dabei machte sich vor allen Dingen die Forschungsgruppe um Druckrey mit Preussmann, Ivankovic und Schmähl (1967) einen Namen. Sie beschrieben neben den chemischen Eigenschaften auch die cancerogene Wirkung eines Großteiles der bis heute untersuchten Nitrosoverbindungen und speziell deren organotrope carcinogene Wirkung.

Wegen der starken krebserzeugenden Wirkung, die für einige Nitrosamine nachgewiesen wurde, gewann auch die Frage nach ihrer Stellung bei der Carcinogenese oder Syncarcinogenese beim Menschen, sowie nach ihrem Vorkommen und ihrer Entstehung an Bedeutung. DuPlessis et al. (1968) beschrieben das Vorkommen von Dimethylnitrosamin in verschiedenen Nahrungsmitteln der transkeiischen Bantus, in deren geographisch eng umschriebenem Gebiet eine signifikant erhöhte Sterblichkeit an Oesophaguscarcinomen auffiel, wobei diese Tumoren, wie Druckrey et al. (1963) schon früher experimentell bewiesen, mit verschiedenen Nitrosaminen im Tierversuch induziert werden können. Ender und Ceh (1968) erforschten den Nitrosamingehalt von Fisch, Fleisch und Pilzen. Marquardt und Hedler (1966) teilten den Nachweis

von Diäthylnitrosamin in Weizenmehl mit. Dieses Ergebnis konnte allerdings von Thewlis (1967, 1968) und Kröller (1967) nicht bestätigt werden. Kröller beschrieb außerdem das Vorkommen von Nitrosaminen in Käse und Tabakrauch. Auch von Neurath (1967) wurden verschiedene Nitrosoverbindungen im Tabakrauch nachgewiesen. Allerdings stellte er dabei die von Serfontein und Hurter (1966) gemachten Konzentrationsangaben in Frage.

Neben dem Problem des Vorkommens von Nitrosoverbindungen und ihrer Wirkung als Carcinogene interessierte die Frage nach den Entstehungsmechanismen der Nitrosamine. Da sie, wie früher bereits festgestellt und von Sander und Schweinsberg (1972) in einer zusammenfassenden Arbeit aufgezeigt wurde, aus sekundären Aminen und Nitrit in niederem pH-Bereich synthetisiert werden können, wurden besonders auch nitritbehandelte Nahrungsmittel untersucht. Schon 1964 beschrieben Ender et al. einen hepatotoxischen Faktor in mit Nitrit versetztem Heringmehl. 1967 konnten sie N-Nitrosodimethylamin aus mit Nitrit behandeltem Hering isolieren. Auch Fazio et al. (1971) zeigten, daß in nitritkonserviertem Fleisch N-Nitrosodimethylamin vorkommen kann. Es wurde auch in geräuchertem Meeresfisch nachgewiesen (Fazio et al., 1971). Daß eine Nitrosaminsynthese auch in Kulturen nitritbildender Bakterien möglich ist, bewies Sander 1968.

Zu weiteren Untersuchungen gab der die Nitrosaminsynthese fördernde niedere pH-Bereich Anlaß, der die Frage nach der Möglichkeit einer Nitrosaminbildung im Magen nach Verzehr nitrithaltiger Nahrungsmittel nahelegte. In Fütterungsversuchen konnten dann auch Sander, Schweinsberg und Menz (1968) im Magen der Ratte eine Nitrosaminbildung nachweisen. Dabei zeigten sich große Unterschiede in der Nitrosierbarkeit der verschiedenen Amine. Unter Verwen-

dung von Diphenylamin konnten Sander und Seif (1969) auch im menschlichen Magen ein positives Ergebnis erzielen. Von weiteren Untersuchungen über die Entstehung von Nitrosaminen unter biologischen Bedingungen berichtet Sander 1971.

Voraussetzung für Untersuchungen über das Vorkommen und die Entstehung von Nitrosaminen ist eine geeignete Nachweismethode. Über verschiedene chemische und chemisch-physikalische Verfahren gab Wasserman (1971) eine Zusammenfassung. Demnach finden folgende Methoden zur Zeit Verwendung: Polarographie, Gaschromatographie, Dünnschichtchromatographie, Reduktions- und Oxydationsreaktionen, Massenspektrographie, Spaltung mit UV-Licht und colorimetrische Bestimmung als Nitrit, Spaltung mit Bromwasser in Eisessig und Nachweis als Amine, Spektrophotometrie. Meist findet heute die Gaschromatographie in Verbindung mit der Massenspektrographie Verwendung, wie sie zum Beispiel von Heyns und Röper (1970) beschrieben wurde. Eine unter definierten Bedingungen wesentlich einfachere Methode wurde von Sander (1967) entwickelt. Sie beruht auf der photolytischen Spaltung von Nitrosaminen (Burgess und Lavanish, 1964; Chow, 1964; Daiber und Preussmann, 1964; Ballweg und Schmähl, 1967). Der qualitative und quantitative Nachweis der Nitrosoverbindungen erfolgt hierbei durch Bestimmung des freigesetzten Nitrits. Das Verfahren eignet sich vor allem als Zweitmethode neben der Gaschromatographie.

Da die Photolyse, wie Sander 1968 zeigte, allgemein anwendbar ist, gelegentlich, wie in der Zwischenzeit festgestellt wurde, aber Störungen aufweist, soll in der folgenden Arbeit die Photolyse einer Überprüfung unterzogen werden. Dabei soll vor allem auch die Verwendbarkeit von Dichlormethan untersucht werden, da dieses für die Extraktion besonders gut geeignete

Lösungsmittel bei der Gaschromatographie mit dem Stickstoffdetektor oft Störungen verursacht. Im Zusammenhang mit der Photolyse, die gleichzeitig eine Hydrolyse bedeutet, ergab sich die Frage, ob auch wenig wasserlösliche oder sogar unlösliche Nitrosamine in Dichlormethan und KOH hydrolysiert werden können, was am Beispiel von N-Nitroso-Methylanilin und Diphenyl-Nitrosamin geklärt werden soll.
Die Anwendung aller Nachweismethoden macht fast immer die Isolierung und Konzentrierung der nur in Spuren vorkommenden Nitrosoverbindungen erforderlich. Verschiedene Wege können hierbei beschritten werden: Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, Isolierung und Konzentrierung durch Wasserdampfdestillation in alkalischer, saurer oder neutraler Lösung. Zur Isolierung niedermolekularer, chemisch stabiler Nitrosamine ist die Wasserdampfdestillation eine zur Zeit viel angewandte Methode. Sie wurde von Eisenbrand et al. (1970) unter verschiedenen Bedingungen erforscht und beschrieben und erfaßt einige der am stärksten cancerogenen und damit wichtigsten Nitrosamine.
Diese beiden Methoden, die Wasserdampfdestillation und die Photolyse, miteinander zu verbinden und eine zuverlässige Methode für den täglichen Laboratoriumsbedarf zum Nachweis wasserdampfflüchtiger Nitrosamine in niedriger Konzentration an Hand von Diäthylnitrosamin auszuarbeiten, war das Ziel dieser Arbeit, wobei die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Gaschromatographie entsprechen und die Photolyse als einfacher qualitativer Nachweis dienen sollte.

II. Experimenteller Teil.

A) Material:

Aus der Gruppe der rein aliphatischen Nitrosamine wurde Diäthylnitrosamin (DÄNA) (synthetisiert und gereinigt im Hygiene-Institut Tübingen) verwandt, als Vertreter der rein aromatischen Diphenylnitrosamin (Schuchart, im Labor durch Umkristallisierung gereinigt). Als weitere Substanz nahm N-Methyl-N-Nitrosoanilin (Schuchart, im Labor frisch destilliert) eine Mittelstellung zwischen diesen beiden Gruppen ein.

Als biologisches Material dienten jeweils 2000 ml einer am Tag zuvor mit Escherichia coli, Laborstamm Nr. C 15 beimpften und 24 h bei 37° bebrüteten Bouillon (Zusammensetzung: 10 g Pepton, 10 g Fleischextrakt, 5 g NaCl auf 1000 ml Wasser). Nach Beendigung der Bebrütung wurde mit 35 ml 5%iger NaOH alkalisiert. Dadurch stieg der pH-Wert von 6,9 auf ungefähr 10 an (pH vor der Bebrütung 7,0).

B) Methodik:

Die untersuchte Methode gliederte sich in folgende Einzelschritte, wobei die unter 1) und 4) angegebenen Bedingungen während der ganzen Untersuchungen konstant gehalten wurden:

1) Extraktion und Konzentration von Nitrosamin aus biologischem Material durch Wasserdampfdestillation.

2) Überführung des Nitrosamins aus der wässrigen in

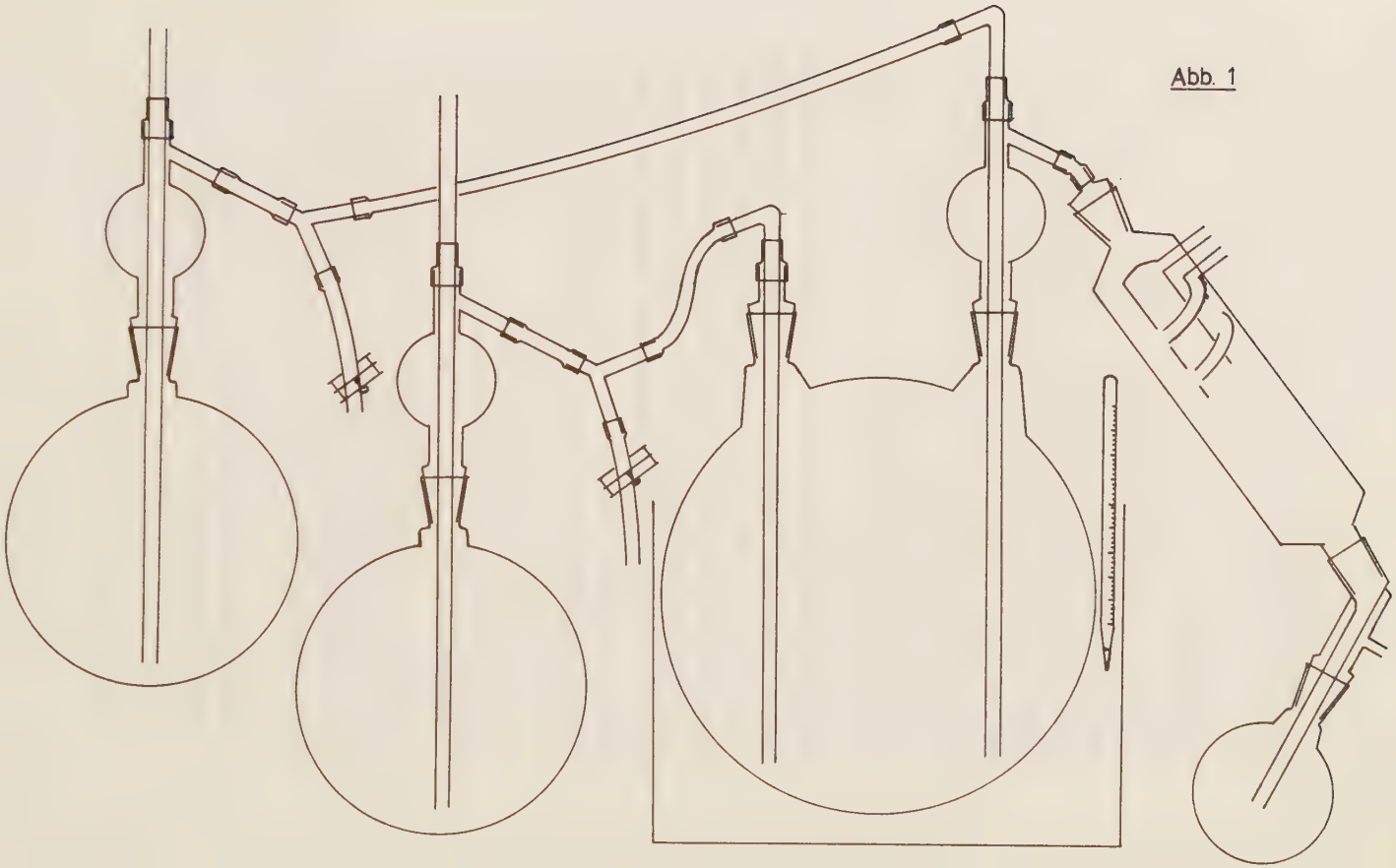


Abb. 1

eine organische Phase bei gleichzeitiger Konzentrierung (Perforation).

3) Photolytische Spaltung des in organischem Lösungsmittel gelösten Nitrosamins.

4) Quantitative (photometrische) Bestimmung der Nitrosaminmenge als Nitrit durch Zugabe von Reagenz nach Grieß-Ilosvay.

Bei den einzelnen Schritten wurde wie folgt vorgegangen:

1) Extraktion und Konzentration von Diäthylnitrosamin aus Bouillon durch Wasserdampfdestillation (Abb. 1):

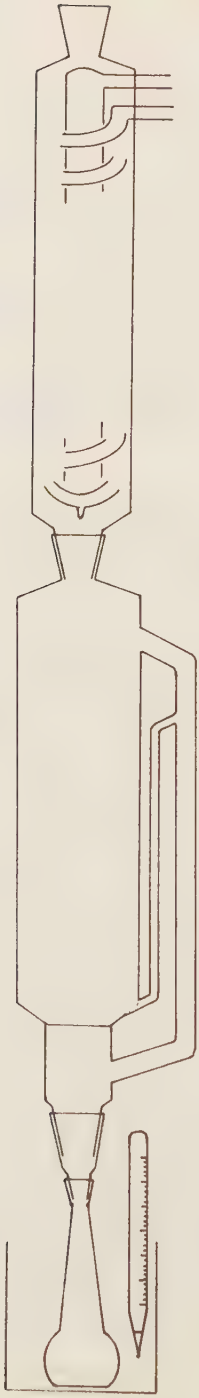
2 l mit E. coli beimpfter Bouillon wurden in einen 6-l-Zweihalskolben gegeben, ebenso eine bestimmte, in Wasser gelöste Menge Diäthylnitrosamin, die im Laufe der Versuchsreihe verändert wurde. Der Kolben befand sich in einem auf ungefähr 80°C erhitzten Wasserbad. Die Bouillon wurde mit Wasserdampf durchströmt, der in zwei 2-l-Kolben erzeugt wurde. In einem Intensivkühler wurde der Dampf kondensiert und das Kondensat in einer Vorlage aufgefangen. Nach Erhalt von 250 ml Destillat wurde die Destillation beendet.

Diese 250 ml Destillat wurden im folgenden Arbeitsgang weiterverarbeitet:

2) Überführung des Nitrosamins aus der wässrigen in eine organische Phase (Perforation) (Abb. 2):

Einem an einen Schliffkolben angeschlossenen Perforator (Fassungsvermögen ungefähr 280 ml) war ein Rückflußkühler aufgesetzt. Der Kolben tauchte in ein Wasserbad ein. In den Perforator wurde Dichlormethan ge-

Abb. 2



geben und dieses vorsichtig mit 250 ml Destillat überschichtet. Dabei trat CH_2Cl_2 durch den Überlauf in den Schliffkolben über. - Das infolge der Erwärmung durch das Wasserbad im Schliffkolben verdampfte Dichlormethan kondensierte am Rückflußkühler und fiel durch die wässrige Phase wieder zum Grund des Perforators. Von dort gelangte es, mit Nitrosamin beladen, durch den Überlauf in den Schliffkolben zurück, von wo es erneut aufstieg. Dabei blieb das Nitrosamin in folge seines höheren Siedepunktes im Schliffkolben zurück.
Um eine Photolyse des Nitrosamins während der Perforation zu verhüten, mußte der Perforator gegen Licht geschützt werden.
Nach unterschiedlich langer Zeit wurde die Perforation beendet und das im Schliffkolben vorhandene Dichlormethan auf verschiedene Weise weiterverarbeitet.

Bei den Versuchen zur Perforation wurden folgende Größen variiert:

a) Fassungsvermögen des Schliffkolbens und sich daraus ergebend die Menge des zugegebenen Dichlormethans und die Weiterverarbeitung des im Schliffkolben aufgefangenen Dichlormethans,

b) Dauer der Perforation und

c) Temperatur des Wasserbades.

zu a) <u>Verschieden große Schliffkolben:</u>

Das Wasserbad wurde auf 78°C erhitzt, die Perforationszeit auf 3 Std. festgesetzt. Das Perforatorrückflußkühler-System war zunächst einem 100-ml-Schliffkolben aufgesetzt. In den Perforator wurden 75 ml CH_2Cl_2 eingefüllt, sodaß bei der Überschichtung mit der in allen Versuchen ungefähr konstanten Menge von 250 ml Destillat etwa 50-60 ml Dichlormethan durch den Überlauf in den 100-ml-Kolben übertraten. Die nach

der Perforation im Schliffkolben verbliebene Menge an nitrosaminhaltigem Dichlormethan wurde im Rotationsverdampfer eingeengt, in einen 10-ml-Kolben umgefüllt und mit CH_2Cl_2 bis auf die 10-ml-Marke aufgefüllt.

Der 100-ml-Kolben wurde in weiteren Versuchen durch einen 20-ml-Kolben ersetzt. Damit entfiel die Benutzung des Rotationsverdampfers, wodurch eine Fehlermöglichkeit ausgeschaltet wurde.

zu b) Dauer der Perforation:

Zur Überprüfung der zur möglichst vollständigen Extraktion des Nitrosamins notwendigen Perforationsdauer wurden folgende Versuche durchgeführt:

α) In 2 Perforator-Rückflußkühler-Systemen mit 100-ml-Kolben wurden 60 ml Dichlormethan bei Perforator I, bzw. 75 ml bei Perforator II, bei dem der Überlauf etwas höher reichte, eingegeben und jeweils mit 250 ml aqua dest. überschichtet, in dem 30 γ Diäthylnitrosamin gelöst waren. Die Perforationszeit betrug 1, 3, 5 und 12 Stunden, die Wasserbadtemperatur 78°C.

β) Bei Verwendung der 20-ml-Verdampferkolben mußten in Perforator I 45 ml, in Perforator II 60 ml Dichlormethan eingegeben werden. In beiden Systemen traten nach Überschichtung des Dichlormethans mit Nitrosaminlösung je 15 ml CH_2Cl_2 durch den Überlauf in die 20-ml-Kolben über. Die Perforation wurde 3, 5 und 12 Std. bei 78°C durchgeführt. - Einige Versuche wurden mit Perforator I bei 90°C mit Perforationszeiten von 1/2, 1 und 2 Stunden vorgenommen. - Das Auffüllen der Kolben bis zur 20-ml-Marke erfolgte nach Beendigung der Perforation durch Schrägstellen des Perforators, wodurch weiteres Dichlormethan durch den Überlauf trat.

zu c) Temperatur des Wasserbades:

Um festzustellen, ob eine Temperatursteigerung Ver-

flüchtigung oder Zerfall des Nitrosamins zur Folge haben könnte, wurde eine konstante Menge DÄNA, in 15 ml CH_2Cl_2 gelöst, direkt in den 20-ml-Kolben gegeben, dem das Perforator-Rückflußkühler-System I aufgesetzt wurde. In den Perforator wurden 30 ml reines CH_2Cl_2 eingefüllt, darüber 250 ml H_2O. Für jeweils 3 Stunden wurden Perforationen bei 78°C, 87°C, 90°C und 97°C durchgeführt.

3) Photolytische Spaltung von in organischem Lösungsmittel gelösten Nitrosaminen:

In Anlehnung an die Angaben von Sander (1967) wurde eine bestimmte Menge einer nitrosaminhaltigen Lösung in je 2 nitritfreie Reagenzgläser mit einer lichten Weite von 14 mm gegeben und mit 0,1n KOH zur Bindung des bei der Bestrahlung frei werdenden Nitrits versehen. Die Reagenzgläser wurden mit Gummistopfen verschlossen. Eine Probe wurde einer langwelligen UV-Strahlung ausgesetzt (Strahlungsmaximum bei 366 nm), eine weitere Probe im Dunkeln aufbewahrt. Als Strahlungsquelle diente eine UV-Lampe mit Schwarzglasfilter (Hersteller: Quarzlampengesellschaft, Hanau). Bei der Bestrahlung wurde ein konstanter Abstand zwischen Flüssigkeitsspiegel im Reagenzglas und UV-Lampe von 12 cm eingehalten. Die Reagenzgläser befanden sich im Winkel von 10° zur Unterlage. Die Bestrahlung erfolgte unter Kühlung durch einen Ventilator.

In den Versuchen mit Diphenylnitrosamin, N-Methyl-N-Nitrosoanilin und DÄNA wurden Bestrahlungsdauer, Menge der zugegebenen 0,1n KOH und des Grieß'schen Reagenzes sowie das organische Lösungsmittel variiert.

Das aus der Destillation und Perforation gewonnene Diäthylnitrosamin wurde folgendermaßen verarbeitet:

Von den durch Einengung mit dem Rotationsverdampfer gewonnenen 10 ml DÄNA-Lösung (Versuch 2a) wurden je

3 ml in Reagenzgläser gegeben, dazu jeweils 2 ml 0,1n KOH. - Somit enthielt eine Probe 3/10 der nach der Perforation im Dichlormethan enthaltenen Nitrosaminmenge. - Die Bestrahlung der Probe erfolgte 2 Stunden. Bestrahlte und unbestrahlte Probe wurden anschließend mit 2 ml Grieß'schem Reagenz versehen.

Von der in den weiteren Versuchen gewonnenen 20 ml DÄNA-Lösung wurden je 5 ml der Lösung in 2 Reagenzgläser gegeben, dazu jeweils 2 ml 0,1n KOH. - Eine Probe enthielt somit 1/4 des nach der Perforation noch im CH_2Cl_2 enthaltenen Nitrosamins.

4) Quantitative (photometrische) Bestimmung der Nitrosaminmenge als Nitrit durch Zugabe von Reagenz nach Grieß-Ilosvay.

Nach der Bestrahlung wurden bestrahlter und unbestrahlter Probe Grieß'sches Reagenz (α-Naphtylamin und Sulfanilsäure in 30 proz. Essigsäure) zugegeben. In Gegenwart von Nitrit wurde ein roter Azofarbstoff gebildet, dessen Konzentration photometrisch an Hand einer Eichkurve bestimmt wurde (Spektralphotometer, Zeiss PMQ IV Spaltbreite 0,01 mm, Wellenlänge 520 nm, Schichtlänge 2 cm).

Beide Proben wurden nach Zugabe des Grieß'schen Reagenzes 15 Minuten stehen gelassen. Dann wurde die wässrige Phase in 2-cm-Quarzküvetten gegeben. Bei 520 nm und einer Spaltbreite von 0,01 wurde die bestrahlte gegen die unbestrahlte Probe im Photometer mit dem Photomultiplier gemessen, wobei zunächst die in der bestrahlten Probe vorliegende Trübung unberücksichtigt blieb.
Bei den weiteren Untersuchungen wurde versucht, die Trübung durch Papierfiltration oder Durchleiten von Stickstoff zu beseitigen.
Weiterhin wurde das nach der Bestrahlung getrübte Dichlormethan, ebenso das nicht getrübte Dichlormethan

der im Dunkeln belassenen Probe sofort nach der Zugabe von Grieß'schem Reagenz abpipettiert. Die zurückgebliebene wässrige Phase wurde 15 Minuten stehen gelassen und dann bei 520 nm photometriert.

C) Ergebnisse:

1) Wasserdampfdestillation:

Bei einer Wasserbadtemperatur von ungefähr 80°C erfolgte eine rasche Destillation, sodaß 250 ml in etwa 1 Stunde abdestilliert wurden.
Dieser Schritt ergab eine Konzentrierung des zunächst in 2 l Bouillon gelösten Diäthylnitrosamins auf 250 ml. Außerdem erfolgte hierbei eine erste Reinigung von störenden Begleitstoffen der Bouillon.

2) Perforation:

a) Verschieden große Schliffkolben:

In den ersten Versuchen, in denen die Perforation unter Verwendung der 100-ml-Kolben während 3 Stunden durchgeführt wurde, ergab sich eine sehr breite Streuung der Extinktionswerte (Abb. 3).
Unter diesen Bedingungen erwies sich die Nachweismethode als nicht brauchbar.

b) Dauer der Perforation:

Die Untersuchungen mit Variation der Perforationsdauer (Abb. 4 u. 5) ergaben starke Streuungen der einzelnen Werte. Auch beim Vergleich der beiden Perforator-Rückflußkühler-Systeme zeigten sich starke Abweichungen der Werte. Außerdem erwies sich, daß die Perforationsdauer in den vorangegangenen Versuchen mit 3 Stunden knapp bemessen war. Dies traf besonders bei Perforator I zu. Die Wiederholung der Versuche mit kleineren Schliffkolben (Abb. 6 u. 7) erbrachte eine Erhöhung der Nitrosaminwerte bei kurzer Perforationsdauer,

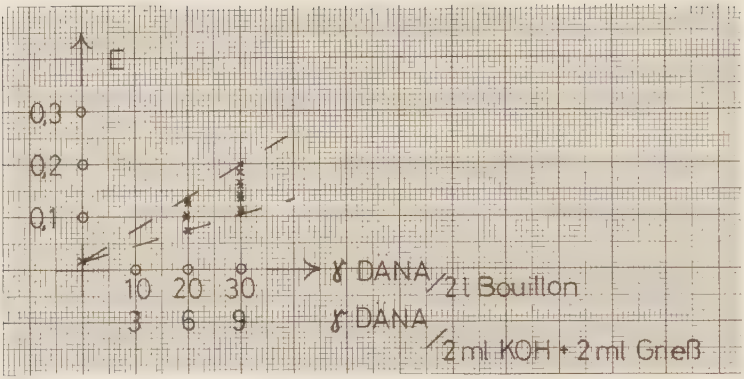


Abb. 3: Destillation von Bouillon mit 20 γ, 30 γ und ohne DÄNA, Perforation in 2 Perforator-Rückfluß-kühler-Systemen (ohne Unterscheidung dieser beiden Systeme) mit 100 ml Kolben für je 3 Stunden. 3 ml CH_2Cl_2-Lösung + 2 ml 0,1n KOH, 2 Stunden UV-Bestrahlung, 2 ml Grieß'sches Reagenz, Vernachlässigung der Trübung, Extinktion bestrahlte gegen unbestrahlte Probe bei 520 nm.

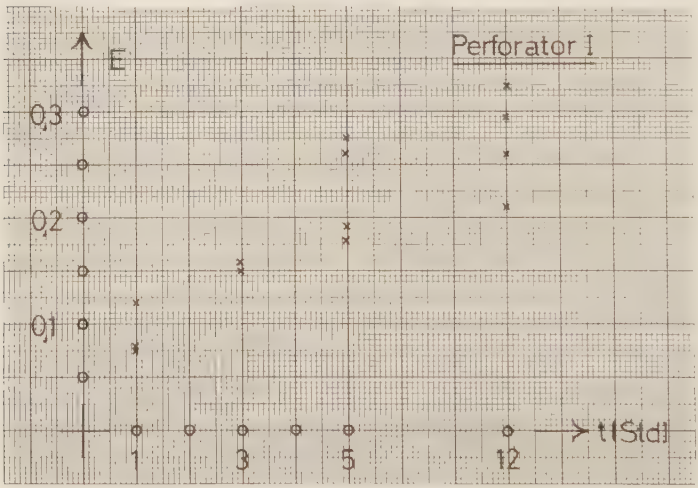


Abb. 4: Perforator I (mit 100-ml-Kolben): Überschichtung von 60 ml CH_2Cl_2 mit 30 γ DÄNA direkt in 250 ml H_2O gelöst, Wasserbadtemperatur 78°C. Perforationsdauer 1, 3, 5 und 12 Stunden. 3 ml CH_2Cl_2-Lösung + 2 ml 0,1n KOH, 2 Stunden UV-Bestrahlung, 2 ml Grieß'sches Reagenz, Einleitung von N_2 in die getrübte Probe für 1-2 Minuten, Extinktion bestrahlte gegen unbestrahlte Probe bei 520 nm.

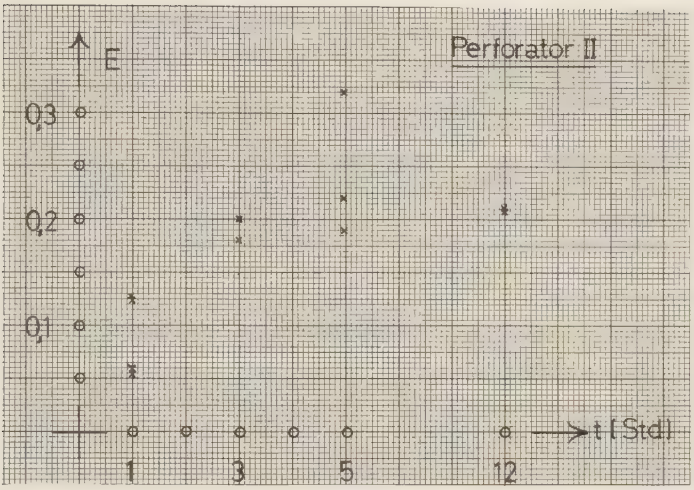


Abb. 5: Perforator II (mit 100-ml-Kolben): Gleiche Bedingungen wie bei Perforator I (Abb.4), nur wurden hier 75 ml CH_2Cl_2 mit der wässrigen DÄNA-Lösung überschichtet.

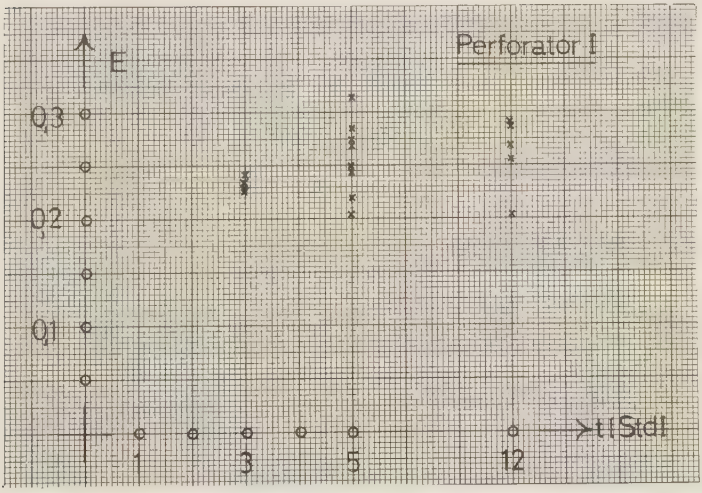


Abb. 6: Perforator I (mit 20-ml-Kolben): Überschichtung von 45 ml CH_2Cl_2 mit 30 % DÄNA direkt in 250 ml H_2O gelöst, Wasserbadtemperatur 78°C. Perforationsdauer 3, 5 und 12 Stunden. 5 ml CH_2Cl_2 - Lösung + 2 ml 0,1n KOH, 2 Stunden UV-Bestrahlung, 2 ml Grieß'sches Reagenz, sofortiges Einleiten von N_2 für 1-2 Minuten zur Beseitigung der Trübung. Extinktion Probe gegen unbestrahlte Probe bei 520 nm.

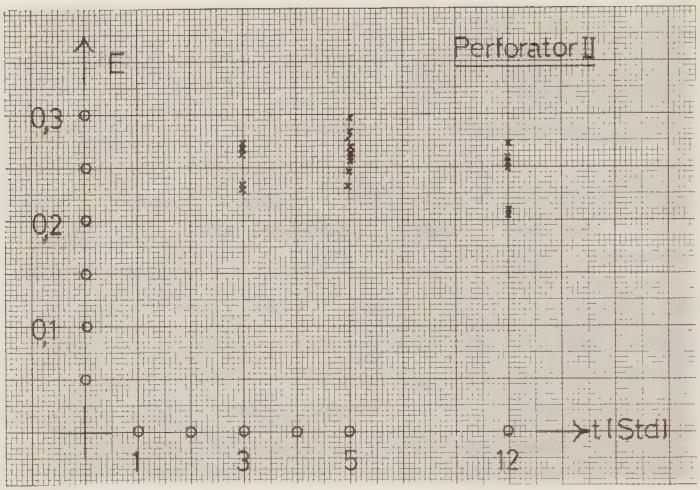


Abb. 7: Perforator II (mit 20-ml-Kolben): Gleiche Bedingungen wie bei der vorigen Abb. 6. Hier wurden aber 60 ml CH_2Cl_2 mit der wässrigen DÄNA-Lösung überschichtet.

Wasserbadtemperatur bei der Perforation	Extinktion bei Zugabe von je 30 γ DÄNA	Tropfenfrequenz des Rückfluß-kühlers
78°	0.260 0.262	gut zählbar, aber unterschiedlich
87°	0.254	noch zählbar
90°	0.253	Übergang zu kontinuierlichem Fluß
97°	0.250 0.233	kontinuierlich

Tab. 1: 30 γ DÄNA in 15 ml CH_2Cl_2 gelöst und direkt in den 20-ml-Kolben gegeben. Gabe von 30 ml CH_2Cl_2 in den Perforator und Überschichtung mit 250 ml H_2O. Perforation für jeweils 3 Stunden bei verschiedener Temperatur.

aber keine entsprechende Steigerung der Ausbeute bei längerer Perforationszeit.
Wie der Vergleich der Abbildungen 4-7 zeigt, brachte der Austausch der Kolben eine Verbesserung der Ausbeute und eine geringere Streuungsbreite. Besonders gering war diese für den 3-Stunden-Wert von Perforator I. Infolgedessen wurde bei den weiteren Versuchen nur noch Perforator I mit einer Perforationszeit von 3 Stunden benutzt.

c) Temperatur des Wasserbades:

Wurde die Temperatur des Perforatorwasserbades erhöht, so zirkulierte mehr Dichlormethan, wodurch mehr Nitrosamin von der wässrigen in die organische Phase überführt wurde. Die Prüfung, ob dabei auch mehr Nitrosamin zerstört oder sich verflüchtigen würde (Tab. 1), ergab für eine Wasserbadtemperatur von 78°C den geringsten Nitrosaminverlust, aber keine genügend stabile Tropfenfrequenz am Rückflußkühler, was möglicherweise unterschiedliche Ergebnisse bei weiteren Versuchen dieser Reihe bewirkt hätte.
Eine relativ konstante Tropfenfrequenz und ein nur geringer Nitrosaminverlust ergab sich für eine Wasserbadtemperatur von 90°C, worauf diese auch für die weiteren Versuche beibehalten wurde.

Eine nochmalige Überprüfung der Perforationszeit bei einer Wasserbadtemperatur von 90°C ergab, daß eine Perforationsdauer von 2 Stunden bei 90°C unter Verwendung eines 20-ml-Kolbens in Verbindung mit Perforator I eine optimale Nitrosaminextraktion aus der wässrigen Phase sicherstellt (Abb. 8).

3) Photolytische Spaltung des in organischem Lösungsmittel gelösten Nitrosamins und Bestimmung als Nitrit durch Zugabe von Reagenz nach Grieß-Ilosvay:

Aus einem Vergleich der Ergebnisse, die mit in Dichlormethan und in Aceton gelöstem Diphenylnitrosamin erhal-

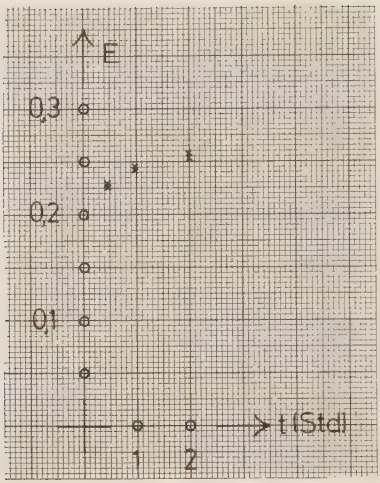


Abb. 8: Abhängigkeit der Extinktion von der Perforationsdauer: Überschichtung von 45 ml CH_2Cl_2 mit 30 γ DÄNA direkt in 250 ml H_2O gelöst. Perforationszeit 1/2, 1 und 2 Stunden. 5 ml CH_2Cl_2-Lösung + 2 ml 0,1n KOH, 2 Stunden UV-Bestrahlung, 2 ml Reagenz nach Grieß, Extinktion Probe gegen unbestrahlte Probe bei 520 nm.

Std.	E_{Aceton}		$E_{CH_2Cl_2}$	
1/2	0.325	0.31	0.061	0.018
2	--	--	0.031	0.038
3	0.35	0.392	--	--

Tab. 2: Je 2 ml Lösung (10 γ/ml) + 1 Tropfen KOH, 1/2, 2 oder 3 Stunden Bestrahlung, 4 ml Grieß'sches Reagenz, Extinktion unbestrahlte gegen bestrahlte Probe nach 15 Minuten unter Vernachlässigung der Trübung.

ten wurden (Tab. 2), erkennt man, daß das wasserunlösliche Diphenylnitrosamin in Dichlormethan gelöst nur wenig Nitrit abspaltete, bei Lösungsvermittlung durch Aceton aber gut spaltbar war. Hierbei muß bedacht werden, daß Aceton im Gegensatz zu Dichlormethan wegen seiner Wasserlöslichkeit eine Verdünnung der wässrigen Phase bewirkte, der Farbstoff sich also auf ein größeres Volumen verteilte.

Nach Erhöhung der zuzugebenden KOH-Menge auf 2 ml und Verminderung der organischen Nitrosaminlösung auf 1 ml wurde ein weiterer Bestrahlungsversuch gemacht. Er brachte die in Abb. 9 aufgezeichneten Ergebnisse.

In einem weiteren Versuch wurde die wässrige Phase durch Steigerung der KOH-Menge weiter vermehrt (Abb. 10). Dies bewirkte nur einen höheren Verdünnungsgrad, nicht aber eine vermehrte Spaltung von Diphenylnitrosamin.

Wie bei der Lösung von Diphenylnitrosamin in Dichlormethan ergaben sich auch bei der Lösung von N-Methyl-N-Nitroso-anilin in CH_2Cl_2 erheblich geringere Extinktionswerte als bei der Lösung in Aceton (Tab. 3).

Somit zeigte sich, daß von den in Dichlormethan gelösten nicht oder nur wenig wasserlöslichen aromatischen Nitrosaminen durch langwellige UV-Strahlen so wenig Nitrit an die wässrige Phase abgegeben wird, daß dieses Verfahren zur quantitativen Bestimmung sehr kleiner Mengen dieser Nitrosoverbindungen nicht verwandt werden kann und damit ungeeignet ist.

Es blieb zu prüfen, ob bei dem gut wasserlöslichen Diäthylnitrosamin eine gute hydrolytische Nitritabspaltung auch dann gefunden wird, wenn das Nitrosamin in Dichlormethan gelöst wird. Hierbei ergab sich eine gute, von der UV-Bestrahlungsdauer abhängige Ausbeute (Abb. 11). Außerdem zeigte sich eine lineare Beziehung zwischen der eingesetzten Nitrosaminmenge und der Menge des abgespaltenen, colorimetrisch nachweisbaren Nitrits (Abb. 12).

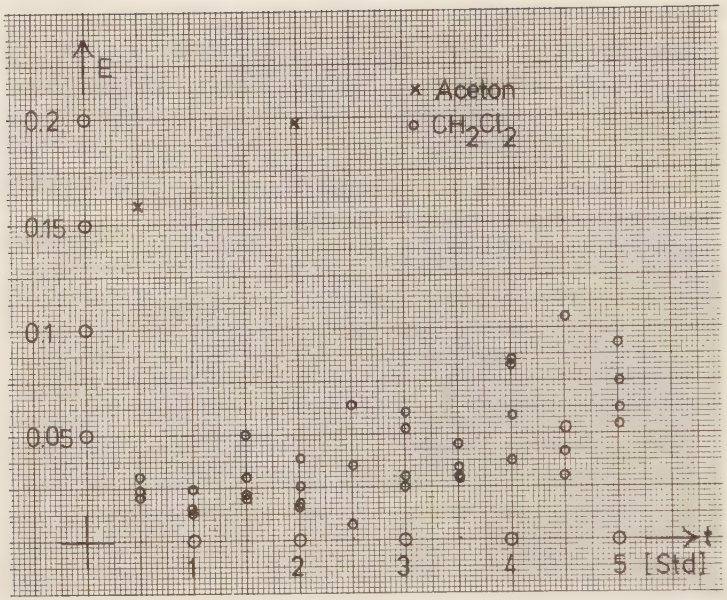


Abb. 9: Bestrahlungs-Zeit-Versuch mit einer Diphenylnitrosamin-Dichlormethan-Lösung bzw. Aceton-Lösung: Je 1 ml dieser Lösungen (10 γ/ml) + 2 ml 0,1n KOH, Bestrahlungszeit 1/2 - 5 Stunden, 2 ml Grieß'sches Reagenz. Nach 15 Minuten Messung der Extinktion bei 520 nm unter Vernachlässigung der Trübung.
x Aceton o Dichlormethan

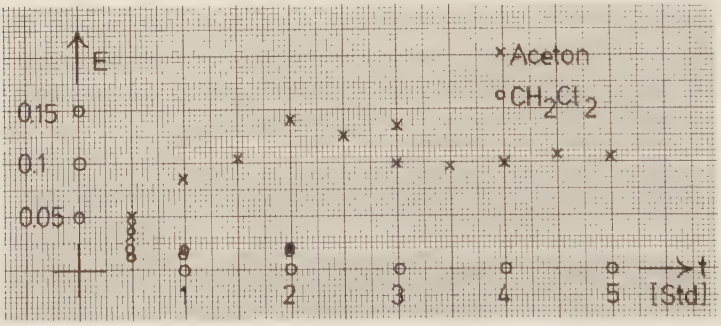


Abb. 10: Bestrahlungs-Zeit-Versuch mit Diphenylnitrosamin in Dichlormethan und Aceton. Je 1 ml dieser beiden Lösungen (10 γ/ml) + 6 ml KOH, 1/2 - 5-stündige Bestrahlung, 2 ml Reagenz nach Grieß-Ilosvay. Nach 15 Minuten Bestimmung der photometrischen Extinktion bei 520 nm unter Vernachlässigung der Trübung.
x Aceton o Dichlormethan

Lösungsmittel	Extinktion
Aceton	0.31; 0.32
CH_2Cl_2	0.045; 0.041; 0.051; 0.053

Tab. 3: Je 1 ml (10 γ/ml) N-Methyl-N-Nitrosoanilin in Dichlormethan bzw. Aceton gelöst, mit 2 ml 0,1n KOH versehen, 2 Stunden bestrahlt, mit 2 ml Grieß-Reagenz versetzt, 15 Minuten stehen gelassen, Extinktion bestrahlte gegen unbestrahlte Probe.

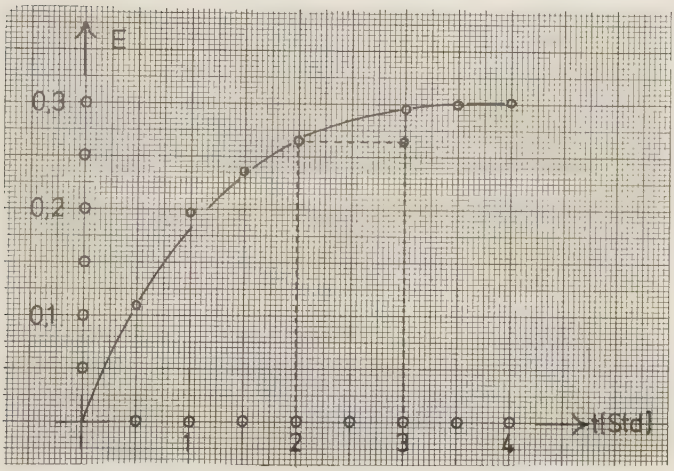


Abb. 11: Bestrahlungs-Zeit-Versuch: 7,5 γ DÄNA in 5 ml Dichlormethan gelöst + 2 ml 0,1n KOH, 1/2- bis 4-stündige Bestrahlung, Zugabe von 2 ml Reagenz nach Grieß. Darauf sofortiges Abpipettieren des Dichlormethans bei bestrahlter und unbestrahlter Probe und Messung der Extinktion nach 15 Minuten.

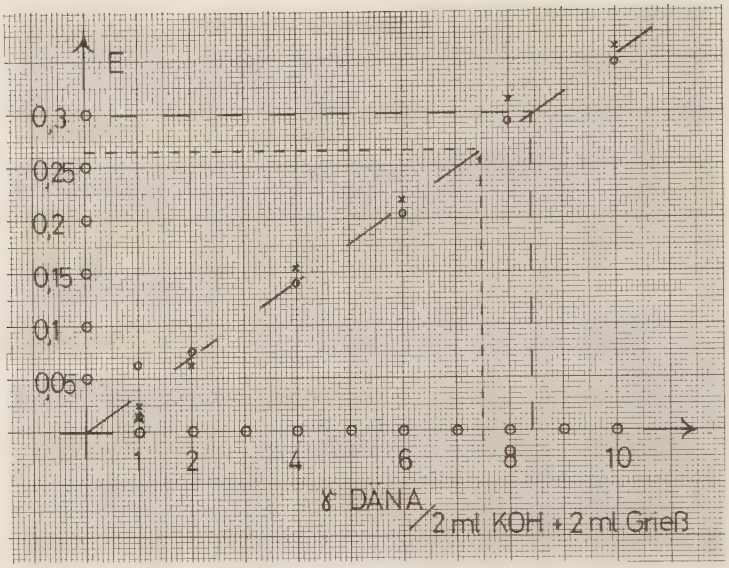


Abb. 12: Verschiedene Mengen DÄNA in je 1 ml Dichlormethan gelöst + 2 ml 0,1n KOH, 2 Stunden UV-Bestrahlung + 2 ml Grieß'sches Reagenz, Abpipettieren der organischen Phase. Nach 15 Minuten Extinktion bei 520 nm.

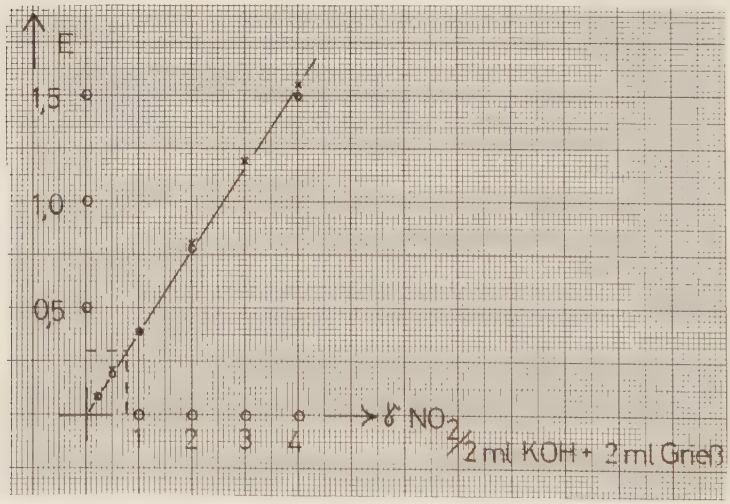


Abb. 13: Verschiedene Mengen $NaNO_2$ in 2 ml 0,1n KOH gelöst, mit 2 ml Grieß'schem Reagenz versehen und nach 15 Minuten bei 520 nm die Extinktion gegen einen Leerwert gemessen, der anstelle des Reagenz' 2 ml 30%ige Essigsäure enthielt.

Zur Ermittlung der unter der Einwirkung der UV-Strahlung freigesetzten Nitritmenge diente eine Nitriteichkurve (Abb. 13).
Aus dem Vergleich zwischen der Nitriteichkurve und dem Versuch zu Abb. 12 ließ sich berechnen, wieviel DÄNA während der 2-stündigen Bestrahlung gespalten wurde:

Das Molekulargewicht beträgt von DÄNA 102, von NO_2 46.

Nun ist aus Abb. 12, Seite 23 zu entnehmen:

$$E = 0{,}3 \mathrel{\hat{=}} 8{,}4\ \gamma\ \text{DÄNA} = \frac{8{,}4}{102} \times 10^{-6}\ \text{Mol DÄNA}.$$

Aus Abb. 13, Seite 22 ergibt sich:

$$E = 0{,}3 \mathrel{\hat{=}} 0{,}75\ \gamma\ NO_2 = \frac{0{,}75}{46} \times 10^{-6}\ \text{Mol } NO_2.$$

Es entspricht aber $\frac{8{,}4}{102} \times 10^{-6}$ Mol gleich 100% und $\frac{0{,}75}{46} \times 10^{-6}$ Mol gleich $\frac{100 \times 0{,}75 \times 102}{46 \times 8{,}4}$ % = 20%.

Demnach wurden also 20% des Diäthylnitrosamins gespalten und ließen sich mit dem Reagenz nach Grieß-Ilosvay nachweisen. Eine Verlängerung der Bestrahlung über 2 Stunden führte, wie aus Abb. 11 hervorgeht, nicht zu einer wesentlichen Erhöhung der nachweisbaren Nitritmenge.

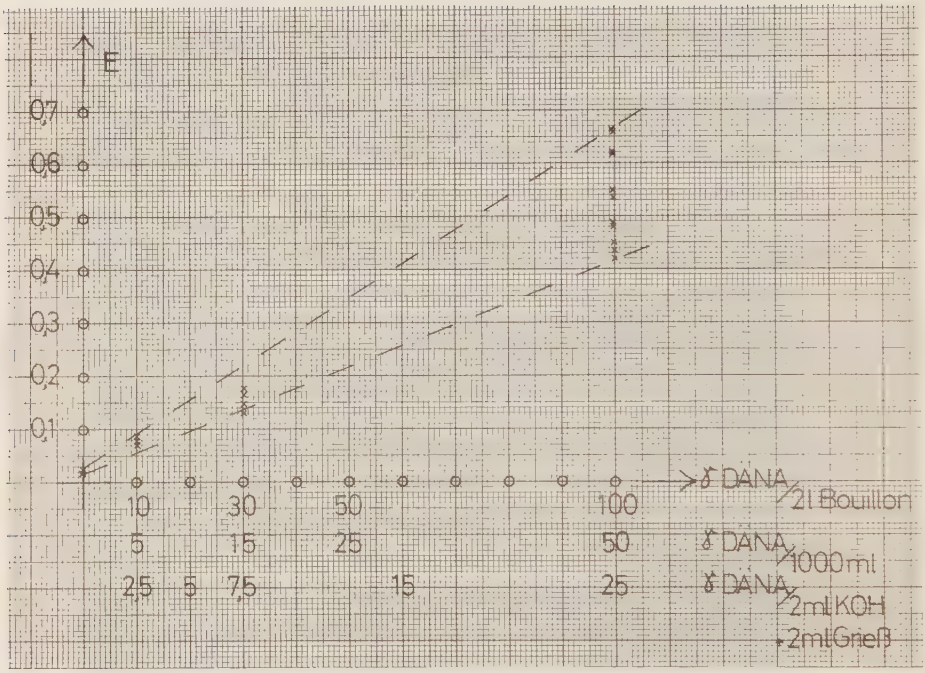


Abb. 14: Extraktion verschiedener, 2 l Bouillon zugegebener Mengen DÄNA durch Wasserdampfdestillation. 3 Stunden Perforation bei 78°C mit Perforator I mit 20-ml-Kolben. 5 ml CH_2Cl_2-Lösung + 2 ml 0,1n KOH, 2 Stunden UV-Bestrahlung + 2 ml Grieß'sches Reagenz. Sofortiges Abpipettieren der organischen Phase bei bestrahlter und unbestrahlter Probe, nach 15 Minuten Extinktion bei 520 nm.

III. Beurteilung.

Der Vergleich verschiedener im Verlauf der gesamten Untersuchungen erstellten Extraktionskurven zeigt die schrittweise Verbesserung der Extraktionsmethode auf.

Der erste Versuch, DÄNA aus einer mit Bakterien beimpften Bouillon zu isolieren, wurde in Abb. 3 dargestellt. Die dabei eingehaltenen Bedingungen erwiesen sich, wie erwähnt, als ungenügend.

Auch der Versuch, durch Austausch der 100-ml-Schliffkolben gegen 20-ml-Schliffkolben ohne Erhöhung der Wasserbadtemperatur genügend genaue Werte zu erhalten, verlief noch nicht befriedigend (Abb. 14).

Erst nachdem auch die Temperatur des Wasserbads auf 90°C erhöht wurde, war die Streuung der Ergebnisse geringer (Abb. 15 mit den Werten von Tab. 4).

Die unter den bei Abb. 15 angegebenen Versuchsbedingungen erhaltene geringe Streuung der Einzelwerte kommt auch bei der Berechnung der Standardabweichung der in Tab. 4 angegebenen Werte nach folgender Formel zum Ausdruck:

$$s = \pm \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Tab. 5: (Standardabweichung der einzelnen Werte):

0 γ DÄNA	$\bar{x}$ = 0.0183	$s = \pm$ 0.0016 = 8,6%
4 γ DÄNA	$\bar{x}$ = 0.044	$s = \pm$ 0.0085 =19,3%
10 γ DÄNA	$\bar{x}$ = 0.0874	$s = \pm$ 0.0065 = 7,4%
30 γ DÄNA	$\bar{x}$ = 0.234	$s = \pm$ 0.0156 = 6,7%
100 γ DÄNA	$\bar{x}$ = 0.745	$s = \pm$ 0.0495 = 6,7%

Außerdem ergab sich neben der geringen Streubreite eine recht gute Ausbeute, wie die folgende Berechnung zeigt:

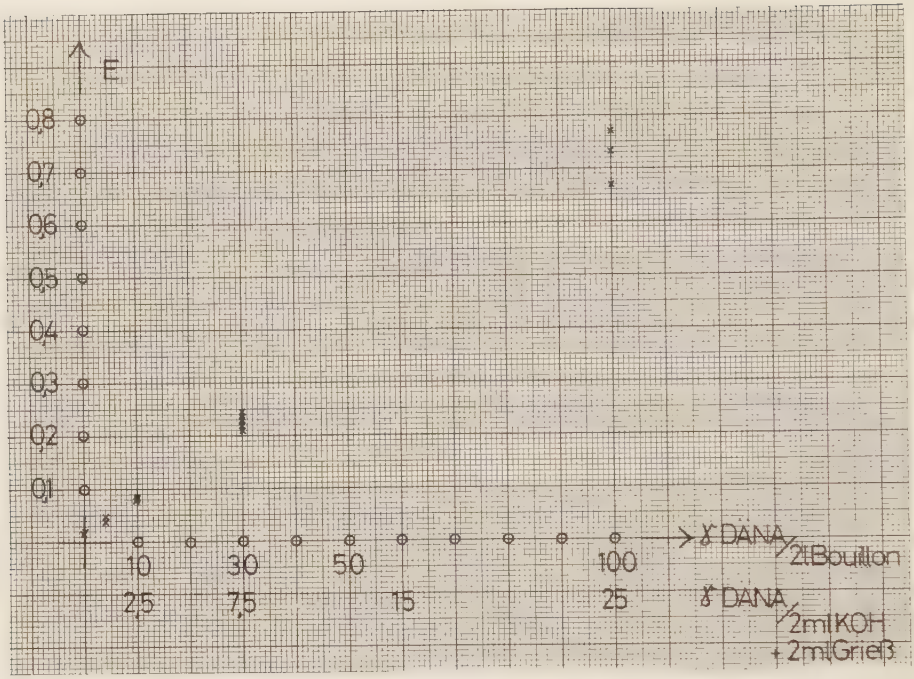


Abb. 15: Extraktion verschiedener, direkt 2 l Bouillon zugegebener Mengen DÄNA durch Wasserdampfdestillation. 2 Stunden Perforation bei 90° C Wasserbadtemperatur. 5 ml DÄNA-Dichlormethan-Lösung + 2 ml 0,1n KOH, 2 Stunden UV-Bestrahlung, 2 ml Grieß'sches Reagenz. Sofortiges Abpipettieren der organischen Phase und Messung der Extinktion der bestrahlten Probe gegen eine entsprechende, im Dunkeln aufbewahrte Probe bei 520 nm.

Zur bebrüteten Bouillon zugegebene Menge DÄNA in	In der bestrahlten Probe enthaltene Menge DÄNA in	Extinktion
0	0	0.017; 0.018; 0.020
4	1	0.038; 0.050
10	2,5	0.080; 0.081; 0.090 0.092; 0.094
30	7,5	0.215; 0.220; 0.242 0.246; 0.249
100	25	0.667; 0.724; 0.777 0.778; 0.779

Tab. 4: Werte der Abb. 15

Aus Abb. 12, Seite 22 ergibt sich:

7,5 γ DÄNA ≙ E = 0.265 ≙ 100%

Aus der Berechnung der Standardabweichung ergibt sich:

$\bar{x}_{30\ \gamma\ DÄNA\ gesamt} = \bar{x}_{7,5\ \gamma\ DÄNA\ pro\ Probe} \triangleq 0.234$

(nur 1/4 der Ausgangsmenge ist pro Probe enthalten)

Daraus folgt: E = 0.265 ≙ 100%; E = 0.234 ≙ 88%

Die Standardabweichung mit eingerechnet, ergibt eine Ausbeute von 88 ± 7%, bzw. einen Verlust von 12 ± 7% im Verlaufe des gesamten Versuchsganges.

Aus den Ergebnissen, die nach Zugabe von direkt in 250 ml H_2O gelöstem DÄNA in den Perforator und 2 Stunden Perforationsdauer erhalten wurden, ließ sich auch der bei der Perforation aufgetretene Verlust berechnen:

Aus Abb. 12, Seite 22 ergibt sich:

7,5 γ DÄNA ≙ E = 0.265 ≙ 100%

Aus Abb. 8, Seite 18 ergibt sich:

$\bar{x}_{30\ \gamma\ DÄNA} = \bar{x}_{7,5\ \gamma\ DÄNA\ pro\ Probe} \triangleq E = 0.256$

Daraus folgt: E = 0.265 ≙ 100%; E = 0.256 ≙ 95%

Damit ergab sich bei der Perforation ein Verlust von 5% und bei der Destillation ein Verlust von 95% - 88% = 7%.

Unter diesen Bedingungen zeigte sich die Nachweismethode also geeignet, Diäthylnitrosamin in niedriger Konzentration reproduzierbar nachzuweisen.
Eine weitere Verbesserung der Methode durch Verwendung eines anderen Lösungsmittels war, wie bereits im Verlauf der Versuche gezeigt wurde, aus folgenden Gründen nicht möglich: Äther war zu leicht flüchtig, und Aceton, in dem DÄNA in einem wesentlich höheren Prozentsatz gespalten wurde, kam wegen seiner Wasserlöslichkeit nicht in Frage. Auch konnte die Wasserbadtemperatur des Perforators wegen der Gefahr der Zerstörung von Nitrosamin nicht weiter gesteigert werden. Eine noch in Frage kommende Verlängerung der UV-Bestrahlung hätte, wie gezeigt wurde, ebenso wie die Verlängerung der Perforationszeit nur eine geringe Steigerung der Ausbeute bei wesentlich stärkerer Belastung der Versuchsapparatur bedeutet.
Auch machte die geringe Abweichung der einzelnen Werte eine weitere Verbesserung der Bedingungen nicht erforderlich, sodaß diese oben aufgezeigten Versuchsbedingungen (Text und Abb. 15) als endgültig angesehen wurden.

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Methode zur Isolierung wasserdampfflüchtiger Nitrosamine aus biologischem Material erarbeitet. Als Modellsubstanz diente Diäthylnitrosamin (DÄNA). Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde überprüft und durch Standardisierung der Einzelschritte optimiert. Diese bestanden aus Wasserdampfdestillation, Perforation und colorimetrischem Nachweis von Nitrosaminen als Nitrit mit dem Reagenz nach Grieß-Ilosvay nach Photolyse durch UV-Licht. Durch schrittweise Verbesserung der Methode gelang es, DÄNA bis in den ppb Bereich nachzuweisen. Der Verlust betrug dabei 12 ± 7% während des gesamten Versuchsganges.
Diesen Untersuchungen gingen Versuche zum Nachweis verschiedener Nitrosamine mittels der Photolyse voraus. Es wurden dabei DÄNA, Diphenylnitrosamin und N-Methyl-N-Nitrosoanilin verwandt. Als Lösungsmittel dienten Äther, Aceton oder Dichlormethan. Dabei zeigte sich Äther wegen seiner leichten Flüchtigkeit für die gegebene Apparatur als unbrauchbar. Diphenylnitrosamin und N-Methyl-N-Nitrosoanilin wurden nur in Aceton ausreichend photolytisch gespalten, während DÄNA auch in Dichlormethan gelöst gut spaltbar war.

Literaturverzeichnis

Ballweg, H. und D. Schmähl: Über Photolyse bei Nitrosaminen.
Naturwissenschaften, 54, 116 (1967)

Barnes, J.M. and P.N. Magee: Some toxic properties of dimethylnitrosamine.
Brit. J. Industr. Med., 11, 167-174 (1954)

Burgess, E.M. and J.M. Lavanish: Photochemical decomposition of N-Nitrosamines.
Tetrahedron Letters, 20, 1221-1226 (1964)

Chow, Yuan-Lang: Photolysis of N-Nitrosamines.
Tetrahedron Letters, 34, 2333-2338 (1964)

Daiber, D. und R. Preussmann: Quantitative colorimetrische Bestimmung organischer N-Nitrosoverbindungen durch photochemische Spaltung der Nitrosaminbildung.
Z. Analyt. Chem., 206, 344-352 (1964)

Druckrey, H., R. Preussmann, S. Ivankovic und D. Schmähl: Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitrosoverbindungen an BD-Ratten.
Z. Krebsforsch., 69, 103-201 (1967)

Druckrey, H.R. Preussmann, G. Blum, S. Ivankovic und J. Afkham: Erzeugung von Karzinomen der Speiseröhre durch unsymmetrische Nitrosamine.
Naturwissenschaften, 50, 100-101 (1963)

DuPlessis, I., J.R. Nunn and W.A. Roach: Carcinogen in a Transkeian Bantu food additive.
Nature, 222, 1198-11 99 (1968)

Eisenbrand, G., A.V. Hodenberg and R. Preussmann: Trace analysis of N-nitroso-compounds II. Steam destillation at neutral, alkaline and acid pH under reduced and atmospheric pressure.
Z. Anal. Chem., 251, 22-24 (1970)

Ender, F. and L. Ceh: Occurence of Nitrosamines in foodstuffs for human and animal consumption.
Fd. Cosmet. Toxicol., 6, 569-571 (1968)

Ender, F., G. Havre, A. Helgebostas, N. Koppang, R. Madsen and L. Ceh: Isolation and indentification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring.
Naturwissenschaften, 24, 637-638 (1964)

Ender, F., G. Havre, R. Madsen., L. Ceh and A. Helgebostas: Studies on conditions under which N-nitrosodimethylamine is formed in herring meal produced from nitrite-preserved herring.
Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk., 22, 181-189 (1967)

Fazio, T., R.H. White and J.W. Howard: Analysis of nitrite-and/or nitrate-processed meats for N-nitrosodimethylamine.
J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 54, 1157-1159 (1971)

Fazio, T., J. Damico, J.W. Howard, R.H. White and J. Watts: Gas chromatographic determination and mass spectrometric confirmation of N-nitrosodimethylamine in smoke-processed marine fish.
J. Agric. Food Chem., 19, 250-253 (1971)

Foreman, J.K., J.F. Palframan and E.A. Walker: Gas chromatographic determination of N-alkylnitrosamines.
Nature, 225, 554 (1970)

Heyns, K. und H. Röper: Ein spezifisches analytisches Nachweisverfahren für Nitrosamine durch Kombination von Gaschromatographie mit der Massenspektrometrie.
Tetrahedron Letters, 10, 737-740 (1970)

Kröller, E.: Untersuchungen zum Nachweis von Nitrosaminen in Tabakrauch und Lebensmitteln.
Deutsche Lebensm. Rundschau, 63, 303-305 (1967)

Magee, P.N. and J.M. Barnes: The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine.
Brit. J. Canc., 10, 114-122 (1956)

Marquardt, P. und L. Hedler: Über das Vorkommen von Nitrosaminen in Weizenmehl.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 16, 778-779 (1966)

Neurath, G.: Zur Frage des Vorkommens von N-Nitrosoverbindungen im Tabakrauch.
Experientia, 23, 400 (1967)

Sander, J.: Eine Methode zum Nachweis von Nitrosaminen.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 348, 852-854 (1967)

Sander, J.: Nitrosaminsynthese durch Bakterien.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 349, 429-432 (1968)

Sander, J.: Untersuchungen über die Entstehung cancerogener Nitrosoverbindungen im Magen von Versuchstieren und ihre Bedeutung für den Menschen.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 21, 1572-1580, 1707-1713, 2034-2039 (1971)

Sander, J. und F. Schweinsberg: Wechselwirkungen zwischen Nitrat, Nitrit und kanzerogenen N-Nitrosoverbindungen.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Org.B, 156, 299 (1972)

Sander, J., F. Schweinsberg und H.P. Menz: Untersuchungen über die Entstehung cancerogener Nitrosamine im Magen.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 349, 1691 (1968)

Sander, J. und F. Seif: Bakterielle Reduktion von Nitrat im Magen des Menschen als Ursache einer Nitrosaminbildung.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1091 (1969)

Serfontein, W.J. and P. Hurter: A method of identifying small amounts of nitrosamines in biological material.
Nature, 209, 1238-1239 (1966)

Serfontein, W.J. and P. Hurter: Nitrosamines as environmental carcinogens II. Evidence for the presence of nitrosamines in tobacco smoke condensate.

Cancer Res., 26, 575-579 (1966)

Thewlis, B.H.: Testing of wheat flour for the presence of nitrite and nitrosamines.
Fd. Cosmet. Toxicol., 5, 333-337 (1967)

Thewlis, B.H.: Nitrosamines in wheat flour
Fd. Cosmet. Toxicol., 6, 822-3 (1968)

Walters, C.L., E.M. Johnson and N. Ray: Separation and detection of volatile and non-volatile N-nitrosamines.
Analyst, 95, 485-489 (1970)

Wasserman, A.E.: A survey of analytical procedures for N-nitrosamines.
in: Bogovski, P., R. Preussmann und E.A. Walker (Hrsgb.): N-nitroso compounds, analysis and formation.
Proceedings of a Working Conference held at the Deutsches Krebsforschungsinstitut, Heidelberg 13-15 October 1971
J A R C Scientific Publications, 3, Lyon 1972

Lebenslauf:

Am 6.1.1947 wurde ich, Martin Knebel, als Sohn des Zahnarztes und Arztes Dr. Werner Knebel und seiner Frau, der Ärztin Dr. Marie-Luise geb. Storz, in Schramberg im Schwarzwald geboren.
Dort besuchte ich auch die Grundschule und das Gymnasium, wo ich im Frühjahr 1966 mein Abitur ablegte.
Im Sommersemester 1966 begann ich in Tübingen mit dem Studium der Medizin und bestand dort im Juli 1969 die ärztliche Vorprüfung. Im Wintersemester 69/70 studierte ich ein Semester in Wien, dem ein Semester an der medizinischen Akademie in Lübeck folgte. Seit dem Wintersemester 70/71 war ich wieder in Tübingen immatrikuliert, wo ich am 23.1.73 das medizinische Staatsexamen bestand.